

汤洪敏云南野生大白口蘑遗传多样性研究

汤洪敏^{1, 2} 吴刚¹ 虞泓^{1*}(¹云南大学生命科学学院生态遗传学实验室, 昆明 650091; ²贵州民族学院化学系, 贵阳 550025)

摘要: 应用 DALP 技术对云南野生大白口蘑遗传多样性进行分析。筛选的 5 组引物在大白口蘑 6 个菌塘的 56 朵子实体中检测到 202 个位点, 其中多态位点 151 个, 多态位点百分比 PPB 为 74.75%。6 个菌塘总的观察等位基因数 N_a 为 1.7475; 总的有效等位基因数 N_e 为 1.4659; Nei's 基因多样性指数 H 为 0.2722; 总的 Shannon 多样性指数 I 为 0.4053; 菌塘总的基因多样性 H_t 为 0.2705, 菌塘内基因多样性 H_s 为 0.012, 菌塘间基因分化系数 G_{st} 为 0.9556, 菌塘的遗传一致度在 0.60 ~ 0.80 之间。结果表明大白口蘑遗传变异有 95.56% 存在菌塘间, 4.44% 存在菌塘内, 即大白口蘑遗传变异绝大多数存在于菌塘之间。

关键词: 菌塘, 直接扩增片断长度多态性

中图分类号: Q939.5 文献标识码: A 文章编号: 1672-6472 (2007) 01-0128-0134

Genetic diversity of *Tricholoma giganteum* Masee in YunnanTANG Hong-Min^{1, 2} WU Gang¹ YU Hong^{1*}

(¹ Laboratory of Ecological Genetics, College of Life Science, Yunnan University, Kunming 650091; ² Department of Chemistry, Guizhou University for Nationalities, Guiyang 550025)

Abstract: Genetic diversity of *Tricholoma giganteum* in Yunnan was determined by using DALP analysis. Five primer groups were screened in 6 shiroes of *T. giganteum*. Among 202 DNA fragments amplified 151 were polymorphic, the percentage of polymorphic bands (PPB) was 74.75%. In the 6 shiroes, the total observed number of alleles (N_a) was 1.7475; the total effective number of alleles (N_e) was 1.4659; the total Nei's gene diversity (H) was 0.2722; the total Shannon's Information index (I) was 0.4053; the total gene diversity (H_t) was 0.2705 while the gene diversity within a shiro (H_s) was 0.012. The coefficient of gene differentiation (G_{st}) was 0.9556 among shiroes, Nei's genetic identity was at the range of 0.60 ~ 0.80. The result indicated that 95.56% genetic variation occurred among shiroes and 4.44% within a shiro, it was suggested that most of genetic variation be among shiroes of *T. giganteum*.

Key words: Shiro, Direct amplification of length polymorphism (DALP)

大白口蘑 *Tricholoma giganteum* Masee, 是一种新近推出的珍稀栽培菌种, 有较高的食、药用价值, 但其物种遗传多样性的研究尚未见报道。本研究运用 DALP 分子标记技术, 以采自云南楚雄同一菌塘的松口蘑 *Tricholoma matsutake* (S. Ito & S. Imai) Singer (子实体 10 朵) 为比较, 对采自云南省思茅、红河地区的六个野生大白口蘑菌塘 (子实体共 56 朵) 的遗传多样性进行了分析。从分子水平探讨了大白口蘑遗传多样性及其变异式样。为大白

基金项目: 贵州省教育厅自然科学基金资助项目 (No. 2004217)

*通讯作者: E-mail address: hongyu@ynu.edu.cn

收原稿日期: 2006-03-14, 收修改稿日期: 2006-08-08

口蘑资源的可持续利用提供基础性资料, 进而为蕈菌选育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料来源

大白口蘑子实体采自云南思茅、红河地区, 由中国科学院昆明植物所杨祝良博士鉴定, 凭证标本现存放于昆明植物所。实验材料来源见表 1。

表 1 实验材料

Table 1 The materials used in this study

物种 Species	菌塘产地 Shiro locality	生境 Habitat	备注 Remark
大白口蘑 T. giganteum	思茅市曼连 (Tr1) Manlian, Simao	腐竹根土壤, 向阳 Humus soil with bamboo, apricus	菌盖浅奶油色, 菌柄较长基部膨大 Pileus surface pale cream. Stipe elongate, cylindrical, swollen at base
	思茅市大寨 (Tr2) Dazhai, Simao	农舍牲畜圈旁空地上 Open land by farmhouse	菌盖浅奶油色, 菌柄较长基部膨大 Pileus surface pale cream. Stipe elongate, cylindrical, swollen at base
	红河州红河县独格 (Tr3) Duge, Honghe	常绿阔叶林下, 向阳斜坡 Under evergreen broad-lesved forest, apricus slope	菌盖浅棕色, 菌柄基部膨大 Pileus surface pale brown. Stipe cylindrical, swollen at base.
	墨江县打东 (Tr4) Dadong, Mojiang	常绿阔叶林下, 阴坡 Under evergreen broad-lesved forest, shade slope	菌盖浅棕色, 菌柄基部膨大 Pileus surface pale brown. Stipe cylindrical, swollen at base.
	思茅市三棵桩 (Tr5) Sankezhuang, Simao	枯树桩旁裸地, 向阳 Open land by exarid stub, apricus	菌盖浅棕色, 菌柄基部膨大 Pileus surface pale brown. Stipe cylindrical, swollen at base.
	思茅市整碗 (Tr6) Zhengwan, Simao	公路边常绿阔叶林缘灌丛 Under scrub by evergreen broad-lesved forest	菌盖浅棕色, 菌柄基部膨大 Pileus surface pale brown. Stipe cylindrical, swollen at base.
松口蘑 T. matsutake	楚雄州双柏县团山田 (Tm) Tuanshantian, Chuxiong	松树林阴湿地 Dank soil under pine forest	菌盖具深红褐色鳞片, 菌柄上下近等粗 Pileus surface reddish-brown covered scales. Stipe cylindrical, rearly equal.

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 提取: 每菌塘分别取 8~10 朵子实体的菌柄、菌盖交界处组织, 总 DNA 提取参照 Lee & Taylor(1990)的方法。总 DNA 用 1%的琼脂糖凝胶(agarose gel)电泳, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溴化乙锭(ethidium bromide, EB)染色, 用 25 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 75 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 的 λDNA 标定。利用 Kodak 1D 分析软件分析并标定到 30 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 备用。

1.2.2 引物筛选: 引物序列见表 2。从 10 组引物中筛选条带清晰、反应稳定的 5 个组合: 选择性引物 DALP221、231、232、234、235 与反向引物 R₁, 进行扩增。

1.2.3 反应体系与扩增程序

采用 20 μL 反应体系, 其中模板 DNA 2 μL (60 ng), 10 \times Buffer with MgCl_2 2 μL (Taq

酶配套), 2.5 mmol/L dNTP Mixture (Promega, 上海生工进口分装) 2 μ L, 0.5 U/ μ L Taq 酶 (Promega, 上海生工进口分装) 5 μ L, 5 pmol/L 选择性引物 (上海生工合成) 3 μ L, 5 pmol/L 反向引物 (上海生工合成) 1 μ L, 灭菌超纯水 5 μ L。

表 2 引物序列

Table 2 Sequences of the primers used in this study

引物 Primer	名称 Name	序列 Sequence
反向引物 Reverse Primer	DALPR ₁	TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC
	DALP221	GTTCCTCCAGTCACGAC GC
	DALP231	GTTCCTCCAGTCACGAC AGC
	DALP232	GTTCCTCCAGTCACGAC GAC
	DALP233	GTTCCTCCAGTCACGAC ACG
选择性引物 Selective Primers	DALP234	GTTCCTCCAGTCACGAC CAG
DALP 2XX	DALP235	GTTCCTCCAGTCACGAC CAC
	DALP241	GTTCCTCCAGTCACGAC TCAG
	DALP242	GTTCCTCCAGTCACGAC CTAG
	DALP243	GTTCCTCCAGTCACGAC TCGA
	DALP244	GTTCCTCCAGTCACGAC CTGA
重扩增和测序通用引物 Re-amplification and sequencing: U.S.P.	-40USP	GTTCCTCCAGTCACGAC

U.S.P: 通用测序引物. 灰色框显示-40 USP 序列

U.S.P., Universal sequencing primers. The grey box indicates the -40 USP sequence

PCR 扩增程序: 用 PE9700 (美国 PE 公司) 扩增仪, 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 分钟, 然后进行 40 个循环: 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 50 $^{\circ}$ C 复性 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

扩增产物检测: PCR 扩增产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳, 溴化乙锭 (EB) 染色, Kodak Image Station 440CF 凝胶成像系统拍照, 检测 DALP 带型是否清晰。

1.2.4 聚丙烯酰胺凝胶制备、电泳及银染显色

参照王海英等 (2005) 的方法。凝胶染色干燥后用计算机图象扫描仪扫描, 保存图片。从保存的扫描图片中统计 DALP 条带。

1.2.5 数据处理

电泳图谱中根据分子量标准对照反应产物在胶上的位置, 估计扩增产物及其分子量。有带记为 1, 无带记为 0, 弱带及重复性不好的条带不予统计, 形成 0/1 矩阵图输入计算机。采用 POPGENE 软件计算出各菌塘的 Nei's 基因多样性指数 (H)、Shannon's 多态性信息指数 (I)、多态位点百分率 (PPB)、基因分化系数 (Gst)、菌塘内基因多样性 (Hs)、菌塘间基因多样性 (Ht) 等相关指标, 并进行 UPGMA 聚类分析。

2 结果与分析

2.1 DALP 电泳图谱分析

筛选获得的 5 个 DALP 引物对供试菌塘的所有子实体 DNA 共扩增 202 条重复性高的清晰条带, 图 2 为 DALP 图谱。

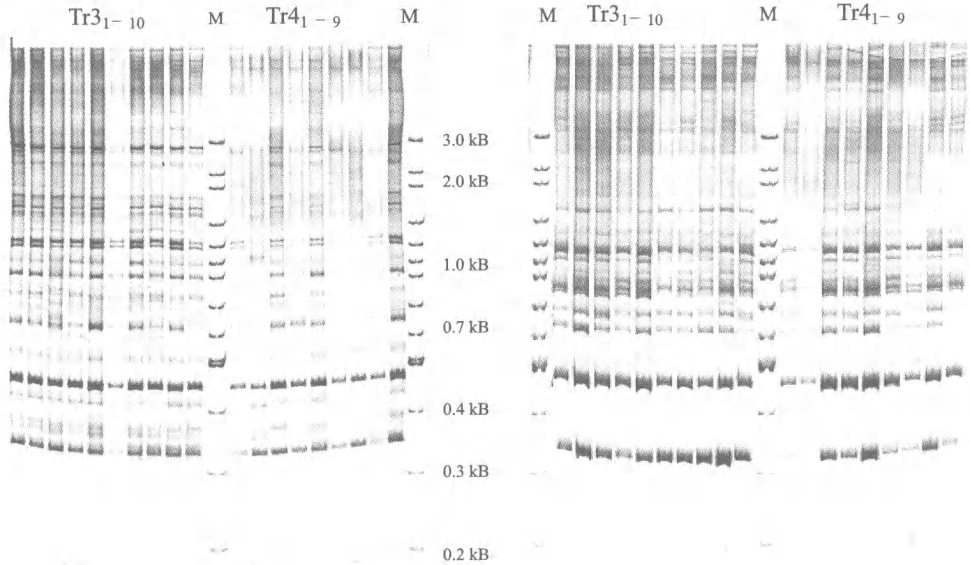


图 2 DALP 指纹图谱示意图

Fig. 2 DNA fingerprints of DALP

扩增 DNA 片断的分子量在 170~2800bp 之间, 每个引物扩增条带数为 35~45 条。在扩增出的 202 条带中有 151 条为多态条带, 6 个菌塘总的多态位点百分比 *PPB* 为 74.75%。但各菌塘的 *PPB* 值均较低, 与 Shannon 多样性指数 *I* 分析结果相同。基于基因频率矩阵, 利用平均观察等位基因数 *N_a*、平均有效等位基因数 *N_e* 和 Nei's 基因多样性指数 *H* 对大白口蘑菌塘的遗传多样性进行评价, 得到了与 Shannon 多样性指数 *I* 分析一致的结果 (表 3)。

2.2 遗传分化及聚类分析

遗传分化相关指标见表 4。大白口蘑 6 个菌塘总的基因多样性指数 *H_t* 为 0.2705, 菌塘内多样性指数 *H_s* 为 0.0120, 菌塘间基因分化系数 *G_{st}* 为 0.9556。大白口蘑约有 95.56% 的遗传变异来自菌塘之间, 4.44% 来自菌塘内子实体间, 遗传变异绝大多数分布在菌塘间, 即大白口蘑遗传变异绝大多数存在于菌塘之间; 而菌塘内不同子实体间的遗传差异非常小, 近乎于一个无性系。

各菌塘的 Nei' 遗传一致度和遗传距离见表 5, 菌塘遗传距离的 UPGMA 聚类图见图 3。

在大白口蘑的 6 个菌塘中, 遗传一致度最大为整碗菌塘和三棵桩菌塘间为 0.8104。最小为三棵桩菌塘和红河县独格菌塘间为 0.5784。多数菌塘的遗传一致度在 0.60-0.80 之间。

大白口蘑 6 个菌塘的 UPGMA 聚类分析显示, 供试的大白口蘑 6 个菌塘被聚为三个小

类群：群 I 由思茅市曼连菌塘 (Tr1) 和思茅市大寨菌塘 (Tr2) 组成；群 II 由思茅市三棵桩菌塘 (Tr5) 和思茅市整碗菌塘 (Tr6) 组成；群 III 由红河县独格菌塘 (Tr3) 和墨江县打东菌塘 (Tr4) 组成。群 I 和群 II 先聚合后再与群 III 聚合。也就是说同一地区地理位置较近的菌塘间遗传一致度高，遗传距离接近，在聚类图上首先聚合；地理隔离较远的菌塘之间，遗传距离相对较大，聚合较晚。而作为外类群的松茸在聚类图上明显与大白口蘑的菌塘分开。

表 3 大白口蘑菌塘遗传多样性

Table 3 Genetic diversity of shiros in *Tricholoma giganteum*

物种	菌塘	总位点数	多态位点数	多态位点百分比	等位基因数	有效等位基因数	Nei's 基因多样性指数	Shannon 多样性指数
Species	Shiro	Total number of loci	Number of polymorphic loci	PPB	N_a *	N_e *	H^*	I^*
大白口蘑	Tr1	202	6	2.97	1.0297	1.0238	0.0132	0.0189
<i>T.giganteum</i>	Tr2	202	2	0.99	1.0099	1.0093	0.0048	0.0067
	Tr3	202	6	2.97	1.0297	1.0237	0.0132	0.0188
	Tr4	202	4	1.98	1.0198	1.0125	0.0071	0.0105
	Tr5	202	5	2.48	1.0248	1.0208	0.0113	0.0161
	Tr6	202	11	5.54	1.0545	1.0402	0.0225	0.0326
	平均	202	5.7	2.82	1.0281	1.0217	0.0121	0.01727
	mean							
总计	202	151	74.75	1.7475	1.4659	0.2722	0.4053	
total								
松口蘑	Tm	202	40	19.80	1.1980	1.1529	0.0838	0.1205
<i>T. matsutake</i>								

* N_a = Observed number of alleles (平均观察等位基因数)

* N_e = Effective number of alleles (Kimura & Crow, 1964) (平均有效等位基因数)

* H = Nei's (1973) gene diversity (遗传多样性指数)

I = Shannon's Information index (Lewontin, 1972) (Shannon 多样性指数)

表 4 大白口蘑菌塘的遗传分化

Table 4 Genetic differentiation among shiros of *T. giganteum*

物种	总基因多样性	菌塘内基因多样性	菌塘间基因分化系数
Species	H_t *	H_s *	G_{st} *
白口蘑 <i>T. giganteum</i>	0.2705	0.0120	0.9556
标准差 SD	0.0349	0.0011	—

* H_t = Total gene diversity ; * H_s = Gene diversity within shiro; * G_{st} = The coefficient of gene differentiation

表 5 遗传一致度和遗传距离

Table 5 Nei's genetic identity and genetic distance

pop ID	Tr1	Tr2	Tr3	Tr4	Tr5	Tr6	Tm
Tr1	****	0.7729	0.5955	0.7149	0.7365	0.6987	0.6071
Tr2	0.2576	****	0.5792	0.6471	0.7524	0.6814	0.5491
Tr3	0.5183	0.5461	****	0.7916	0.5784	0.5843	0.4002
Tr4	0.3356	0.4352	0.2337	****	0.6792	0.6689	0.5169
Tr5	0.3059	0.2845	0.5475	0.3869	****	0.8104	0.6017
Tr6	0.3586	0.3836	0.5374	0.4021	0.2103	****	0.5612
Tm	0.4990	0.5994	0.9158	0.6600	0.5080	0.5777	****

遗传一致度 (对角线上方) 和遗传距离 (对角线下方)

Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal)

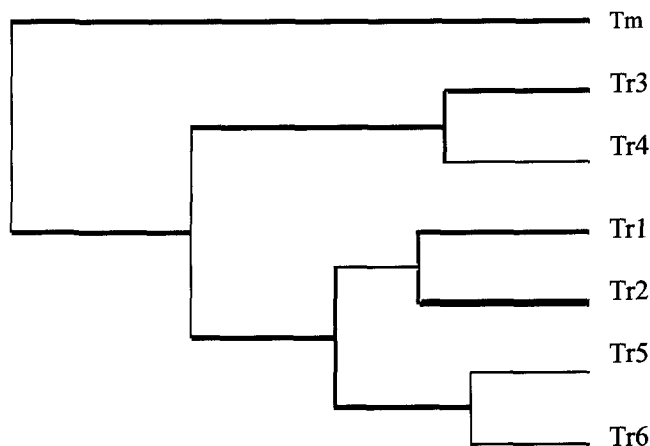


图 3 遗传距离的 UPGMA 聚类图

Fig.3 UPGMA dendrogram based on Nei's (1978) genetic distance

3 讨论

本研究中采用 DALP 分子技术对大白口蘑遗传多样性进行检测, 研究结果表明大白口蘑同一菌塘内子实体间的遗传变异非常小, 只约有 4.44%, 这与其生长特性是相吻合的。大白口蘑是基部相连、丛生的大型真菌, 能以菌丝的无性繁殖在适宜的生境中生长多年。观察研究还发现, 如遇环境条件恶劣, 菌丝还可通过形成厚垣孢子构成其生活史中的无性小循环 (文章另行发表)。因此可以认为同一菌塘内的子实体相当于是一个无性系, 其子实体间的遗传变异甚微。大白口蘑物种的遗传变异绝大多数分布在菌塘间约有 95.56%, 菌塘间遗传一致度在 0.60-0.80 之间, 6 个菌塘总的多态位点百分比 PPB 为 74.75%。因此, 大白口蘑绝大多数遗传变异存在于菌塘之间, 并且菌塘间遗传差异的大小, 与其距离的远近

有密切关系。从总体上看,随着空间距离的增大,菌塘间的遗传异质性相应增高。代江红和林芳灿(2001)在对野生香菇的遗传关系研究中也得出了相同的结论。

当今世界上食、药用菌的栽培面临的一个严重问题是所用生产菌株的遗传变异背景狭窄(Khush *et al.*,1992; 赵勇等 2003),这使得它们的杂交育种面临巨大困难(Royse & May, 1982)。本研究表明,大白口蘑物种具有丰富的遗传多样性,作为珍稀栽培菌种颇具开发利用价值。在大白口蘑开发利用过程中,应广泛收集不同地理种源的野生菌塘种质资源,为其栽培育种提供更多的选择素材,并注重野生大白口蘑优良性状菌株之选育,运用到人工栽培中。

本文是把 DALP 技术运用到高等真菌遗传多样性检测的一种尝试,由于 DALP 是共显性标记,共显性数据提高了数据可信度、提供了完整的遗传信息,加上 DALP 对 DNA 纯度和质量要求不高、技术难度低、耗费小等优点(Desmarais *et al.*, 1998),有望成为高等真菌遗传多样性检测的重要技术之一。

[REFERENCES]

- Dai JH, Lin FC, 2001. Spatial distribution and genetic relationships among individuals in a natural population of *Lentinula edodes*. *Mycosystema*, **20** (1): 100-106 (in Chinese)
- Desmarais E, Lanneluc I, Lagnel J, 1998. Direct amplification of length polymorphism (DALP), or how to get and characterize new genetic markers in many species. *Nucleic Acids Research*. **26** (6): 1458-1465.
- Khush RS, Becker E, Wach M, 1992. DNA amplification polymorphisms of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Appl Environ Microbiol*, **58** (9): 2971-2977
- Kimura M, Crow JF, 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, **49**: 725-738
- Lee SB, Taylor JW, 1990. Isolate of DNA from fungal mycelia and single spore. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky TJ, White TJ, eds. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. New York: Academic Press. 282-287
- Lewontin RC, 1972. Apportionment of human diversity. *Evol Biol*, **6**: 381-398
- Nei M, 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, **89**: 583-590
- Royse DJ, May B, 1982. Genetic relatedness and application in selective breeding of *Agaricus brunnescens*. *Mycologia*, **74**: 569-571
- Wang HY, Yu H, Li NG, He R, Zhang MY, 2005. DALP analysis on genetic diversity of *Iphigenia indica* in Yunnan. *Acta Botanica Yunnanica*, **27** (2): 156-162 (in Chinese)
- Zhao Y, He DM, Chen MJ, Tan Q, Pan YJ, 2003. Application of esterase isoenzyme and RAPD technique to heterosis study of *Lentinula edodes*. *Mycosystema*, **22** (4): 549-556 (in Chinese)

[附中文参考文献]

- 代江红, 林芳灿, 2001. 香菇自然群体中个体间的空间分布及其遗传联系. 菌物系统, **20** (1): 100-106
- 王海英, 虞泓, 李南高, 和锐, 张明宇, 2005. 云南丽江山慈菇遗传多样性的 DALP 分析. 云南植物研究, **27** (2): 156-162
- 赵勇, 贺冬梅, 温亚丽, 陈明杰, 谭琦, 潘迎捷, 2003. 酯酶同工酶及 RAPD 技术在香菇杂种优势研究中的应用. 菌物系统, **22** (4): 549-556